

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 20520091151410

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

平面磷脂双层膜的制备及其性质研究

Preparation and Characterization of a Phospholipid  
Bilayer membrane

王 洋

指导教师姓名: 颜佳伟 副教授

毛秉伟 教授

专 业 名 称: 物 理 化 学

论文提交日期: 2012 年 7 月

论文答辩日期: 2012 年 7 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 7 月

# **Preparation and Characterization of a Phospholipid Bilayer membrane**

A Dissertation Submitted for the Degree of Master of Philosophy

By  
Yang Wang

Supervised by  
Assoc. Prof. Jia-Wei Yan  
Prof. Bing-Wei Mao

Department of Chemistry  
Xiamen University  
July, 2012

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

<b>摘 要</b>	I
<b>Abstract</b>	III
<b>第一章 绪论</b>	1
§ 1.1 人工仿生膜体系	2
§ 1.1.1 囊泡 (liposome)	2
§ 1.1.2 非支撑磷脂双层膜 (BLMs)	4
§ 1.1.3 支撑磷脂双层膜 (s-BLMs)	6
§ 1.2 支撑磷脂双层膜相变行为的研究进展	9
§ 1.2.1 支撑磷脂双层膜相变机理探究	10
§ 1.2.2 支撑磷脂双层膜相变行为的影响因素	13
§ 1.3 平面磷脂双层膜系统的力学性质研究进展	16
§ 1.3.1 支撑磷脂双层膜力学性质研究	16
§ 1.3.2 非支撑磷脂双层膜力学性质研究	21
§ 1.4 本论文的研究目的及设想	24
参考文献	24
<b>第二章 实验</b>	34
§ 2.1 实验试剂及材料	34
§ 2.2 实验仪器	35
§ 2.2.1 MEMS 实验仪器	35
§ 2.2.2 其它实验仪器	36
§ 2.3 原子力显微术	37
§ 2.3.1 原子力显微术的基本原理	38
§ 2.3.2 原子力显微术的工作模式	39
参考文献	43

<b>第三章 悬浮氮化硅多孔膜和囊泡制备</b>	45
§ 3.1 基于微球刻蚀技术制备悬浮氮化硅纳米多孔膜	46
§ 3.1.1 ICP 和 BOE 刻蚀制备掩膜窗口	47
§ 3.1.2 胶体微球技术制备氮化硅纳米孔	50
§ 3.1.3 体硅及二氧化硅层的腐蚀	55
§ 3.1.4 悬浮氮化硅多孔膜的表征	57
§ 3.2 囊泡制备	58
§ 3.2.1 超声法制备小囊泡	59
§ 3.2.2 电诱导法制备大囊泡	61
§ 3.3 本章小结	64
参考文献	64
<b>第四章 平面磷脂双层膜的制备及其相变行为研究</b>	67
§ 4.1 支撑磷脂双层膜的相变行为	68
§ 4.1.1 支撑磷脂双层膜的构建	68
§ 4.1.2 支撑磷脂双层膜的相变行为	70
§ 4.2 非支撑磷脂双层膜的相变行为	73
§ 4.2.1 非支撑磷脂双层膜的构建及表征	73
§ 4.2.2 非支撑磷脂双层膜的相变行为	78
§ 4.3 本章小结	85
参考文献	85
对本论文工作的回顾和展望	87
作者攻读硕士学位期间发表的论文	88
致 谢	89

## Contents

<b>Abstract in Chinese .....</b>	<b>I</b>
----------------------------------	----------

<b>Abstract in English.....</b>	<b>III</b>
---------------------------------	------------

<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
-------------------------------------	----------

<b>§ 1.1 Artificial bionic membrane system .....</b>	<b>2</b>
--	----------

§ 1.1.1 Liposome .....	2
------------------------	---

§ 1.1.2 Free-standing bilayer lipid membranes (SLBs) .....	4
--	---

§ 1.1.3 Supported bilayer lipid membranes (s-SLBs) .....	6
--	---

<b>§ 1.2 The phase transition behavior of phospholipid bilayer .....</b>	<b>9</b>
--	----------

§ 1.2.1 Mechanism of the phase transition behavior of s-SLBs .....	10
--	----

§ 1.2.2 Factors affecting the phase transition behavior of s-SLBs .....	13
---	----

<b>§ 1.3 Mechanical characteristics of phospholipid bilayer .....</b>	<b>16</b>
---	-----------

§ 1.3.1 Mechanical characteristics of s-SLBs .....	16
--	----

§ 1.3.2 Mechanical characteristics of SLBs .....	21
--	----

<b>§ 1.4 Motivation of this thesis.....</b>	<b>24</b>
---	-----------

<b>References.....</b>	<b>24</b>
------------------------	-----------

<b>Chapter 2 Experimental .....</b>	<b>34</b>
-------------------------------------	-----------

<b>§ 2.1 Reagents and materials. ....</b>	<b>34</b>
---	-----------

<b>§ 2.2 Instruments .....</b>	<b>35</b>
--------------------------------	-----------

§ 2.2.1 Instruments in MEMS.....	35
----------------------------------	----

§ 2.2.2 Other instruments .....	36
---------------------------------	----

<b>§ 2.3 Atomic Force Microscopy (AFM) .....</b>	<b>37</b>
--	-----------

§ 2.3.1 Working principle of AFM .....	38
--	----

§ 2.3.2 Operating modes of AFM .....	39
--------------------------------------	----

<b>References</b> .....	43
-------------------------	----

## **Chapter 3 Fabrication of Nanoporous Silicon Nitride Membranes and Vesicle** .....

45

<b>§ 3.1 Colloidal Lithography-Based Fabrication of Suspended Nanoporous Silicon Nitride Membranes</b> .....	46
§ 3.1.1 ICP and BOE etching .....	47
§ 3.1.2 Fabrication of nanopore using colloidal lithography .....	50
§ 3.1.3 Etching of Si and Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	55
§ 3.1.4 Characterization of Nanoporous Silicon Nitride Membranes .....	57
<b>§ 3.2 Preparation of Vesicle</b> .....	58
§ 3.2.1 Ultrasonic method .....	59
§ 3.2.2 Electrically induce method .....	61
<b>§ 3.3 Summary</b> .....	64
<b>References</b> .....	64

## **Chapter 4 Preparation of phospholipid bilayer and the phase transition behavior** .....

67

<b>§ 4.1 The phase transition behavior of s-SLBs</b> .....	68
§ 4.1.1 Preparation of s-SLBs .....	68
§ 4.1.2 The phase transition behavior of s-SLBs .....	70
<b>§ 4.2 The phase transition behavior of SLBs</b> .....	73
§ 4.2.1 Preparation and characterization of SLBs .....	73
§ 4.2.2 The phase transition behavior of SLBs .....	78
<b>§ 4.3 Summary</b> .....	85
<b>References</b> .....	85



<b>Review and Prospect .....</b>	<b>87</b>
<b>Publications During Master Study.....</b>	<b>88</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>89</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

生物膜是细胞的重要组成部分，细胞的能量转换、信息的识别和传递、物质的运送等基本生命过程都与生物膜密切相关。平面磷脂双层膜作为一种最接近生物膜的动态自组装双层分子膜，已经被广泛用作在分子水平上对生物膜的结构与功能进行仿生研究的模型，从而克服了天然生物膜组成、功能、结构过于复杂而带来的研究困难。平面磷脂双层膜的相变行为是磷脂双层膜的重要性质，了解平面磷脂双层膜的相变性质对于平面磷脂双层膜更广泛的应用和自然生物膜的生理机制的了解具有重要的意义。

本论文工作主要围绕支撑和非支撑两种平面磷脂双层膜的构建和温控相变行为展开研究。分别以<100>硅单晶和硅基悬浮氮化硅纳米多孔膜为基底，采用囊泡法制备支撑磷脂双层膜和非支撑磷脂双层膜。利用温控原子力显微术（AFM）研究和比较支撑磷脂双层膜和非支撑磷脂双层膜的相变行为。主要内容和结果如下：

1. 基于胶体微球刻蚀技术和 MEMS 硅体刻蚀技术联用，通过粒径为 200 nm 的荷电聚苯乙烯球（PS）单分散自组装并结合镀 Cr 层作为掩膜层，利用 ICP 刻蚀，然后结合 MEMS 腐蚀技术，制备了孔径为 200 nm 的悬浮氮化硅纳米多孔膜。分别利用超声法和电诱导法制备粒径为 50~60 nm 的小囊泡和粒径为 1.5~2  $\mu\text{m}$  的大囊泡。小囊泡可以制备面积足够大的支撑磷脂双层膜和非支撑磷脂双层膜。小囊泡制备的非支撑磷脂双层膜成功率较低，且纳米孔处较难形成磷脂双层膜。为了提高成功率，我们利用粒径为微米级别的大囊泡破裂的方法制备非支撑磷脂双层膜。AFM 实验表明非支撑磷脂双层膜具有自我修复的能力。

2. 利用温控原子力显微镜（AFM）成像模式对小囊泡法制备的 DMPC 支撑磷脂双层膜进行表征。实验结果表明，随着温度的升高，DMPC 支撑磷脂双层膜由凝胶相向厚度较小的液晶相转变。DMPC 支撑磷脂双层膜的表面形貌随温度的改变，证明其是温度敏感的体系。

3. 利用温控原子力显微镜（AFM）力曲线模式对大囊泡法制备的 DMPC 非支撑磷脂双层膜进行表征。实验结果表明，非支撑磷脂双层膜的膜破力随着温度

升高而减小,与文献中报道的支撑磷脂双层膜的膜破力变化趋势一致;非支撑磷脂双层膜的粘滞力随着温度升高而减小,与文献中报道的支撑磷脂双层膜的粘滞力的变化趋势相反。

**关键词:** 平面磷脂双层膜; 磷脂膜相变; 囊泡; 原子力显微镜 (AFM)

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Cellular membrane is an important component of cell and closely related to many life phenomena, such as energy conversion of cell, information recognition and transport. Phospholipid Bilayer are self-assembly, dynamic and closely similar to cellular membranes, and can be used for fundamental studies of cellular membranes at molecular level, which is very difficult to achieve with natural biological membrane owing to their complexities in components, structures, and functions. Studies of the phase transition behavior of phospholipid bilayer benefit understanding the physiological mechanism of natural biological membrane and the applications of phospholipid bilayer.

In this work, we focus on the preparation of phospholipid bilayer and the investigation of the phase transition behavior of phospholipid bilayer. Supported bilayer lipid membranes and free-standing bilayer lipid membranes were prepared by vesicle rupture on Si(100) and Silicon-based nanoporous membranes. We utilized temperature-dependent atomic force microscopy to examine the gel-fluid phase transition behavior in supported bilayer lipid membranes and free-standing bilayer lipid membranes. The main contents and results are as follows:

(1) We fabricated suspended nanoporous silicon nitride membranes on a silicon wafer by combined colloidal lithography and standard silicon fabrication technology. Polystyrene particles (PS) were monodispersed on a  $\text{Si}_3\text{N}_4$  membrane based on electrostatic repulsions. This was followed by Cr masking, ICP etching and silicon wet-etching processes to form 200-nm nanopores through suspended nitride membranes. 50-60 nm small unilamellar vesicle and 1.5-2  $\mu\text{m}$  large unilamellar vesicle were prepared by ultrasonic method and electrically induce method. Supported bilayer lipid membranes and free-standing bilayer lipid membranes could be prepared by small unilamellar vesicle. But, preparing bilayer lipid membranes by large unilamellar vesicle shows much higher probability of success rate, and self-repair of free-standing bilayer lipid membranes was observed by AFM.

(2) Supported bilayer lipid membranes were characterized by variable temperature atomic force microscopy (AFM). The results indicate that with the change of temperature, supported bilayer lipid membranes display a phase transition from a solid-ordered phase to a liquid disordered phase.

(3) The breakthrough force of free-standing bilayer lipid membranes decrease

with the rise of temperature. It is consistent with that of the supported bilayer lipid membranes. However, the tether force decrease with the rise of temperature, which is different from that of supported bilayer lipid membranes.

**Keywords:** Phospholipid Bilayer; Phospholipid Bilayer Phase Transitions; vesicle; Atomic Force Microscopy (AFM)

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 绪论

生物膜是细胞的重要组成部分，它是由脂类、蛋白质以及糖类等组成的超分子体系，细胞的能量转换、信息的识别和传递、物质的运送等基本生命过程都与生物膜密切相关<sup>[1]</sup>。十九世纪后半叶开始，人们就非常重视生物膜的结构、组成、性质等方面的研究。近二三十年以来，随着各种实验技术的发展，生物膜研究成为分子生物学和细胞生物学领域发展最为快速的前沿课题之一。根据 1972 年 Singer 和 Nicolson 提出的生物膜液态镶嵌模型（fluid mosaic model）<sup>[2]</sup>，由脂类分子排列成双分子层结构，构成生物膜的基本骨架，蛋白质结合在脂类骨架上，糖类通过共价键与某些脂类或蛋白质组成糖脂或糖蛋白。

由于生物膜的复杂性，通常对生物膜不同组分进行分离重组，分别对其研究，弄清楚各个组分的功能和不同组分之间的相互作用。生物膜的基本骨架是磷脂双层，磷脂双分子层的结构跟生物膜比较类似，因此可以利用磷脂分子在离体的条件下构建磷脂双层膜，并在磷脂双层膜的基础上设计和制备结构和功能跟生物膜的相似的仿生生物膜，最终揭示整个生物膜的生理机制。

1962 年，Mueller、田心棣和 Rudin，首次在水相中成功制备出非支撑磷脂双层膜（free-standing bilayer lipid membranes，简称 BLMs），BLMs 能很好地模拟细胞内外的环境，但是 BLMs 较差的稳定性制约了其应用。田心棣等人<sup>[4, 5]</sup>在 BLMs 基础上制备出稳定性更好的介质支撑磷脂双层膜（supported bilayer lipid membranes，简称 s-BLMs）。s-BLMs 被广泛用于模拟生物膜的结构和功能的研究<sup>[6, 7]</sup>。

平面磷脂双层膜（包括 BLMs 和 s-BLMs）作为一个常用的人工仿生膜体系，被广泛用于探究磷脂双层膜的各种性质。而在磷脂双层膜的各种性质研究过程中，磷脂双层膜的相变行为成为人们研究的热点课题。本章首先介绍平面磷脂双层膜（包括 BLMs 和 s-BLMs）的基本概念及其制备方法，然后介绍人工仿生生物膜体系相变性质以及平面磷脂双层膜系统力学性质的研究进展，最后提出本论文的研究目的和设想。

## § 1.1 人工仿生生物膜体系

### § 1.1.1 囊泡 (vesicle)

#### 1、囊泡概述

囊泡,是由脂双分子层将水相分隔成内外两部分的膜体系。囊泡作为一种封闭的脂双层结构,是一种在结构形式上与活细胞最为接近的人工模拟膜体系。自从 20 世纪 60 年代发现囊泡以来<sup>[8]</sup>,囊泡技术在生物和药物研究中得到了广泛的应用。囊泡主要分为多层囊泡 (multi-lamellar vesicle, MLV) 和单层囊泡 (unilamellar vesicle),如图 1.1 所示。其中,单层囊泡根据粒径的大小分为小单层囊泡 (small unilamellar vesicle, SUV) 和大单层囊泡 (large unilamellar vesicle, LUV)。

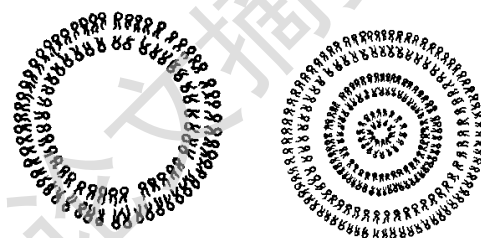


Fig.1.1 Schematic diagram of unilamellar vesicle and multi-lamellar vesicle

#### 2、囊泡的制备

针对不同的囊泡有不同的制备方法。下面分别讨论 MLV、SUV 和 LUV 的制备方法。

##### 1) MLV 的制备

MLV 的制备是囊泡制备技术里最简单的,MLV 也是最早被研究和应用的囊泡。典型的方法是,在圆底烧瓶中加入磷脂的氯仿溶液,通入氮气去除溶剂氯仿,此时磷脂分子会在烧杯壁形成磷脂薄膜。然后将烧瓶置于真空中过夜,以便除去剩留的溶剂,再加入水溶液,在相变温度以上水化几个小时。最后用旋涡混合器振摇,就可以得到 MLV 的悬浮液。这样制备的多层囊泡大小不均匀,一般在 0.2~1  $\mu\text{m}$ 。

##### 2) SUV 的制备

制备 SUV 的方法主要有三种:

最简便常用的方法是超声法,将制备的 MLV 悬浮液超声处理,在超声波的影响下,囊泡会重组形成粒径较均一的单层囊泡,其粒径一般为 25~50 nm。

第二种方法是注入法。将磷脂的乙醇溶液快速注入缓冲液中,自发在缓冲液

中形成 SUV。这种方法制备的 SUV 粒径一般为 30~100 nm。

第三种方法是排挤法。用高压将 MLV 悬浮液通过一个 French 滤器，多次排挤后可以得到大小均一，粒径为 25~50 nm 的小单层囊泡。

### 3) LUV 的制备

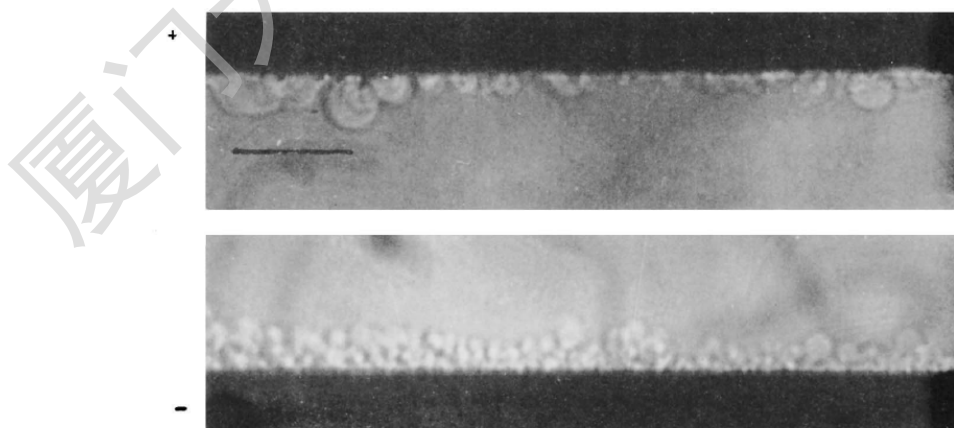
相对于 MLV 和 SUV 而言，LUV 的制备要更难一些，而且制备的 LUV 更加不稳定。目前为止，已经发展了多种 LUV 的制备方法，主要有以下几种：

第一种为注入法。将非极性溶剂中的磷脂溶液在使溶剂能挥发的条件下注入到水溶液中，溶液中的溶质即以薄膜的形式残留在气泡和液相的界面上。

第二种为反相蒸发法。首先将脂质溶解在挥发有机溶剂中，同时在溶液中加入水相溶液，震荡分散，在通氮气的情况下超声几分钟使形成均相稳定的乳白色溶液，此时脂质分子形成内翻性微团 (inverted micelle)。然后将此混合物转移到旋转蒸发器中，用水泵抽气去除有机溶剂，当大部分溶剂去除之后，悬浮液呈凝胶状，经几次旋涡振荡后继续减压蒸发到均一的悬浮液，此时形成的是包裹水相的单层囊泡溶液。

第三种方法为融合法。将 SUV 融合起来形成 LUV，融合过程能够包裹部分溶液相。文献报道，将负电荷磷脂的 SUV 和  $\text{Ca}^{2+}$  混合，再用 EDTA 螯合  $\text{Ca}^{2+}$ ，可以形成大单层囊泡。

第四种方法为电诱导法。将磷脂的氯仿溶液滴在圆柱铂电极上面，用氮气吹干，在真空下数小时去除残留溶剂。将电极置于纯水中，并外加一定的电场，LUV 就会在电极表面形成，如图 1.2 所示。



**Fig.1.2** Formation of liposome-like structures on the anode (+) and cathode (-) from DMPC in distilled water at 30°C, and 1.2 V d.c. The effective dried lipid layer thickness corresponds to 12 bilayers. The bar represents 100  $\mu\text{m}$ .<sup>[10]</sup>



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库